

## DialogWeb

Command Search

new search

databases

alerts

order

cost

logoff

help

- For more records, click the Records link at page end.
- To change the format of selected records, select format and click Display Selected.
- To print/save clean copies of selected records from browser click Print/Save Selected.
- To have records sent as hardcopy or via email, click Send Results.

☒ Select All☒ Clear Selections

Print/Save Selected

Send Results

Format

Display Selected

Short

1. ☐ 3/7/1

## 05452599 ANTI-MCP-1 HUMAN MONOCLONAL ANTIBODY

Pub. No.: 09-067399 [JP 9067399 A]

Published: March 11, 1997 (19970311)

Inventor: OOKA HISAYOSHI

TAKAGI SHIRO

MITA IZUMI

SATOZAWA NOBORU

WATANABE AYAKO

YOKOMATSU TOMOKO

Applicant: MITSUI TOATSU CHEM INC [000312] (A Japanese Company or Corporation), JP (Japan)

Application No.: 07-221794 [JP 95221794]

Filed: August 30, 1995 (19950830)

## ABSTRACT

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject new antibody capable of binding to human monocyte chemotactic activation factor (human MCP-1) and suppressing action of MCP-1, free from adverse effect and useful for treating and preventing diseases accompanying inflammation, e.g. idiopathic pulmonary fibrosis, glomerulonephritis and arterial sclerosis.

SOLUTION: This monoclonal antibody is bound to human monocyte chemotactic activation factor (human MCP-1). The antibody binds to MCP-1 concerning accentuation and activation of chemotaxis of monocyte and macrophage and suppresses its action and is useful as a treating and preventing agent, etc., of diseases accompanying inflammation reaction in which monocyte and macrophage participates, e.g. idiopathic pulmonary fibrosis, glomerulonephritis and arterial sclerosis. The monoclonal antibody is obtained by separating blood cells by Ficoll separating liquid from peripheral blood of a normal subject to provide a human mononucleosis fraction, then infecting the fraction with Epstein-Barr virus(EBV) and culturing the fraction and selecting human MCP-1 antibody-producing monocyte from the cultured products and fusing the monocyte with a myeloma cell, culturing the fused cell, selecting a strain which forms colony and culturing the strain.

JAPIO (Dialog® File 347): (c) 2005 JPO &amp; JAPIO. All rights reserved.

☒ Select All☒ Clear Selections

Print/Save Selected

Send Results

Display Selected

Format

Short

Command

Submit

Previous

AB

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-67399

(43) 公開日 平成9年(1997)3月11日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 K 16/24			C 0 7 K 16/24	
A 6 1 K 39/395	A B E		A 6 1 K 39/395	A B E N
C 1 2 N 5/10			C 1 2 P 21/08	
15/02			C 1 2 N 5/00	B
C 1 2 P 21/08		9162-4B	15/00	C
審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 5 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号 特願平7-221794

(22) 出願日 平成7年(1995)8月30日

(71) 出願人 000003126

三井東圧化学株式会社

東京都千代田区霞が関三丁目2番5号

(72) 発明者 大岡 久芳

千葉県茂原市東郷1900番地の1 三井東圧  
化学株式会社内

(72) 発明者 高木 司郎

千葉県茂原市東郷1144番地 三井東圧化学  
株式会社内

(72) 発明者 三田 泉

千葉県茂原市東郷1900番地の1 三井東圧  
化学株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗MCP-1ヒトモノクローナル抗体

(57) 【要約】

【課題】 単球やマクロファージの走化性のこう進と活性化を促すヒトMCP-1に結合してその働きを抑制する抗MCP-1ヒトモノクローナル抗体、および該ヒトモノクローナル抗体を産生する細胞株、ならびに該ヒトモノクローナル抗体を含有する炎症を伴う疾患に対する薬剤を提供する。

【解決手段】 抗ヒトMCP-1抗体を産生するヒトリンパ球をEBVで形質転換し、得られた形質転換細胞とヒトミエローマ細胞とを融合することにより、抗MCP-1ヒトモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ株MA01を得る。

【効果】 本発明のヒトモノクローナル抗体は、単球やマクロファージの走化性のこう進と活性化に関与するMCP-1に結合してその働きを抑制し、かつヒト由来である為、ヒトに対し有用な、炎症を伴う疾患の治療・予防剤となり得る。

【発明の実施の形態】本発明のモノクローナル抗体は、ヒトリンパ球に由来するヒトモノクローナル抗体である。本発明のヒトモノクローナル抗体のグロブリンタイプは、MCP-1との結合性を有する限り特に制限されないが、例えばIgG、IgM、IgA、IgE、IgD等が挙げられる。本発明のヒトモノクローナル抗体は、ヒトモノクローナル抗体を産生する細胞株から得られるものの他に、酵素消化や遺伝子組み換え等により作製したフラグメント、他の蛋白質あるいは因子との融合体蛋白質であって、ヒトMCP-1との結合を有する限り本発明の範疇である。また、ヒトMCP-1との結合性を損なわない限り、遺伝子組み換えによる改変も可能である。

【0009】本発明のヒトモノクローナル抗体を産生する細胞株は、抗MCP-1ヒトモノクローナル抗体を産生する限り特に限定はないが、抗ヒトMCP-1抗体を産生するヒトリンパ球をエプスタイン・バー・ウイルス（EBV）で形質転換して得ることができ、更にこの形質転換細胞とヒトミエロマ細胞とを細胞融合したハイブリドーマとして得ることができる。また、抗ヒトMCP-1抗体を産生するヒトリンパ球とヒトミエロマ細胞とを細胞融合したハイブリドーマとして得ることもできる。さらに、ヒトリンパ球から抗体遺伝子を取り出して、これを適当なベクターに組み込むことにより産生細胞を作製しても良い。このような抗MCP-1ヒトモノクローナル抗体産生細胞株の例としては、例えばハイブリドーマ株MA01（FERM P-15052）があげられる。

【0010】本発明のヒトモノクローナル抗体を産生する細胞を得るための、抗ヒトMCP-1抗体を産生するヒトリンパ球は、ヒト末梢血やリンパ節等から取得できる。ヒト生体内に存在し、ヒトMCP-1と結合できる抗体を作り得るリンパ球であれば本発明に用いることができる。通常、マウスやウサギ等でモノクローナル抗体やポリクローナル抗体を取得する際に行われるMCP-1の免疫は、必要がない。

【0011】本発明のヒトモノクローナル抗体の調製は、上記の抗MCP-1ヒトモノクローナル抗体を産生する細胞株を各種公知の方法を用いて培養・精製すればよく、細胞の増殖及びMCP-1ヒトモノクローナル抗体の産生を阻害しないものであれば特に制限はない。

【0012】本発明の抗MCP-1ヒトモノクローナル抗体を含有する薬剤は、単球及びマクロファージの関与する炎症反応の関わる疾患、例えば特発性肺繊維腫、子球体腎炎、動脈硬化等の予防や治療に有用となることが期待される。

【0013】

【実施例】以下実施例を示して本発明を説明するが、本発明はこれに限られるものではない。

実施例1 抗MCP-1ヒトモノクローナル抗体の作製

a) EBV形質転換

健康人より末梢血20mlを採取し、フィコール分離液（大日本製薬）により血球分離を行い、ヒト単核球画分を得た。これをRPMI-1640培地（日水製薬）で2度洗浄し、ヒト単核球 $3 \times 10^7$ 個を調製した。遠心分離（1,600rpm、6分間）によりペレットを得、あらかじめ37℃に保温したB95-8細胞の培養上清（B95-8細胞を、20%牛胎児血清（FCS）を含むRPMI-1640培地で培養したときの培養上清）30mlを加えて再懸濁した。37℃の炭酸ガスインキュベーターに移し、90分間保温してEBVを感染させた。遠心分離（1,600rpm、6分間）によりペレットを得、該ペレットを20%FCSを含むRPMI-1640培地60mlに懸濁し、懸濁液を96穴プレート（Corning）6枚に分注した。37℃の炭酸ガスインキュベーターに移し、3～5日毎に半量ずつ培地交換を行いながら培養した。

【0014】b) 抗体産生の確認

上記a)の培養から20日後にコロニー形成の確認されたウエルについて、培養上清中の抗体活性をヒトMCP-1を抗原として用いたドット・イムノバインディングアッセイ（DIBA）法により測定した。リコンビナント・ヒトMCP-1（PeproTech）を $50 \mu\text{g/ml}$ 濃度に水に溶解した。これをグリッド付のニトロセルロース膜（トヨヨー）に $0.2 \mu\text{l}$ ずつスポットした後風乾し、固定化抗原とした。固定化抗原を、ブロック液（10%FCSを含む生理的塩濃度のトリス塩酸緩衝液（TBS））でブロッキングした。サンプルとなる培養液 $50 \mu\text{l}$ を96穴U底プレートに取り、これにブロッキングした固定化抗原を入れ、室温で2時間振とうした。TBSでウエルを洗浄後、パーオキシダーゼ標識抗ヒトイムノグロブリン抗体（DAKO）をブロック液で500倍に希釈してウエルあたり $50 \mu\text{l}$ ずつ添加し、室温で2時間振とうした。ウエルをTBSで洗浄後、コニカイムノステイン（コニカ）により染色し、発色を肉眼で確認した。

【0015】c) 細胞融合

上記b)において抗体活性の確認されたウエルの細胞を、6穴プレートまで拡大培養した。 $2 \times 10^6$ 個の細胞と、あらかじめ20%FCSを含むIMDM培地で培養したSHM-D33（ATCCより入手） $1 \times 10^6$ 個を遠心チューブに集め、遠心分離（1,600rpm、6分間）によりペレットを得た。このペレットを細胞融合用培地（0.25Mマンニトール、0.1mM塩化カルシウム、0.1mM塩化マグネシウム、0.2mMトリス塩酸緩衝液（pH7.2））で2度洗浄して再びペレットを得た後、ペレットを細胞融合用培地0.4mlに再懸濁し、電気融合法（融合装置：島津SSH-1、融合チャンパー：島津FTC-02）により細胞融合を行った。融合条件は、交流高周波電界：1MHz、

10

20

30

40

50

【図1】

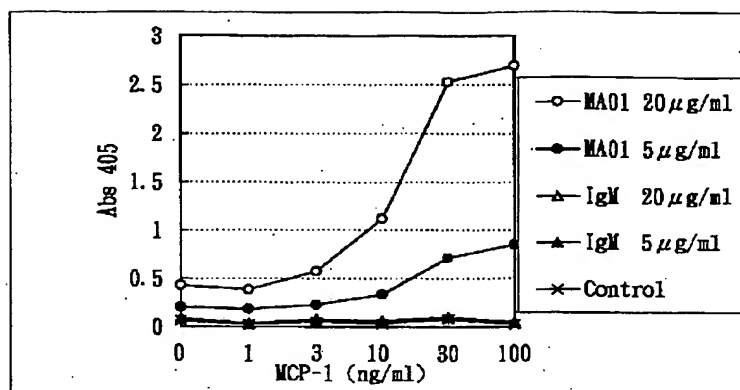


図1 抗MCP-1ヒトモノクローナル抗体の液相におけるヒトMCP-1抗原に対する結合性

フロントページの続き

(51) Int. Cl. 6

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

//(C 1 2 P 21/08

C 1 2 R 1:91)

(72)発明者 里澤 昇

千葉県茂原市東郷1144番地 三井東圧化学  
株式会社内

(72)発明者 渡邊 綾子

千葉県茂原市東郷1900番地の1 三井東圧  
化学株式会社内

(72)発明者 横松 知子

千葉県茂原市東郷1144番地 三井東圧化学  
株式会社内